

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

AB

(11)Publication number : 2002-034568

(43)Date of publication of application : 05.02.2002

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 39/09
A61P 31/04
C07K 14/195
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 15/09
C12R 1:01)
(C12P 21/02
C12R 1:01)

(21)Application number : 2000-220472

(71)Applicant : NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH
HIGETA SHOYU CO LTD
FUJITA GAKUEN

(22)Date of filing : 21.07.2000

(72)Inventor : OZAWA MAKOTO
MIYAUCHI AKIRA
MURAHASHI YASUAKI
YOKOMIZO YUICHI
IMADA YUMIKO
TSUJI TAKAO

(54) METHOD FOR COLLECTING AND PURIFYING RECOMBINANT ANTIGEN THAT PROTECTS PIG FROM ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently and industrially collecting and purifying an antigen that protects a pig from Erysipelothrix rhusiopathiae and is usable for producing Erysipelothrix rhusiopathiae vaccine.

SOLUTION: This method comprises the steps of culturing Brevibacillus choshinensis transformed with a gene encoding 46.5 KPA protein having an antigenic activity of Erysipelothrix rhusiopathiae (46.5 kDa protective protein), filtrating the obtained culture broth using a precise membrane filter to collect an antigen protein and cells in a condensed state, washing the antigen protein and cells with an alkaline buffer to solubilize only the antigen protein, filtrating the obtained mixture, and further applying the anion exchange chromatography to the obtained filtrate fraction for purification.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.05.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3532510

[Date of registration] 12.03.2004

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-34568
(P2002-34568A)

(43) 公開日 平成14年2月5日 (2002.2.5)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/09	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/09		A 6 1 P 31/04	1 7 1 4 B 0 6 4
A 6 1 P 31/04	1 7 1	C 0 7 K 14/195	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/195		C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/21		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5

審査請求 有 請求項の数 4 O L (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-220472(P2000-220472)

(22) 出願日 平成12年7月21日 (2000.7.21)

(71) 出願人 591111248

農林水産省家畜衛生試験場長
茨城県つくば市観音台3-1-1

(71) 出願人 000112060

ヒゲタ醤油株式会社
東京都中央区日本橋小網町2番3号

(71) 出願人 000125381

学校法人藤田学園
愛知県豊明市栄町南館12番地の1

(72) 発明者 小澤 良

千葉県銚子市三軒町6-14

(74) 代理人 100075775

弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換え豚丹毒菌防御抗原の回収精製法

(57) 【要約】

【解決手段】 豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 抗原活性を有する 46.5 K P A のタンパク質 (豚丹毒菌防御抗原 46.5 K P A : 46.5 k D a p rotective antigen) をコードする遺伝子で形質転換した *Brevibacillus choshinensis* を培養し、その培養物を精密濾過膜で濾過して抗原タンパク質と菌体を濃縮し、これをアルカリ緩衝液で洗浄して抗原タンパク質のみを可溶化、濾過し、得られた濾過画分を更に陰イオン交換クロマト処理して精製する。

【効果】 本発明によって効率的且つ工業的に回収、精製された豚丹毒菌防御抗原は、純度が非常に高く、豚丹毒菌ワクチンの製造に利用することができる。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 豚丹毒菌防御抗原活性を有する蛋白質（46.5kPa）をコードする遺伝子で形質転換したブレヴィバチルス・チョウシネンシスを培養し、その培養物を、

（1）精密濾過膜で濾過処理し、更に中性域～弱アルカリ域の緩衝液で洗浄して、豚丹毒菌防御抗原蛋白質と菌体を濃縮する工程、

（2）豚丹毒菌防御抗原蛋白質と菌体の濃縮画分を精密濾過膜を用いてアルカリ緩衝液で洗浄することにより、豚丹毒菌防御抗原蛋白質を濾過画分に集める工程、

（3）濾過画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離回収する工程、からなることを特徴とする豚丹毒菌防御抗原の回収精製法。

【請求項2】 精密濾過膜としてポアサイズ0.8μm以下、好ましくは0.5μm以下の精製濾過膜を使用し、中性域～弱アルカリ域の緩衝液として10～100mMトリス緩衝液（pH7～9.5）を使用し、アルカリ緩衝液として10～100mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（9～12）を使用し、イオン交換体として、DEAE、DEAA、TEAE、ECTEOAから選ばれる少なくともひとつを用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行うこと、を特徴とする、請求項1に記載の回収精製法。

【請求項3】 豚丹毒菌防御抗原活性を有する蛋白質（46.5kPa）をコードする遺伝子で形質転換したブレヴィバチルス・チョウシネンシスを培養し、その培養物を、

（1）0.22μmの精密濾過膜で濾過処理し、更に50mMトリス緩衝液（pH8.5）で洗浄することによって培養物中に含まれる培地由来の成分などの夾雑物を濾過画分に除き、豚丹毒菌防御抗原蛋白質と菌体を濃縮する工程、

（2）豚丹毒菌防御抗原蛋白質と菌体の濃縮画分を0.22μmの精密濾過膜及を用いて50mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH10～11）で洗浄することにより豚丹毒菌防御抗原蛋白質を可溶化せしめて、これを濾過画分に集める工程、

（3）濾過画分をDEAEによる陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離回収する工程、からなることを特徴とする豚丹毒菌防御抗原の回収精製法。

【請求項4】 請求項1～3のいずれか1項に記載の回収精製法によって得られた高純度に精製された豚丹毒菌防御抗原を利用すること、を特徴とする豚丹毒予防用ワクチンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ブレヴィバチルス・チョウシネンシス（*Brevibacillus choshinensis*）を宿

2

主菌とする遺伝子組換え体を培養することによって生産された豚丹毒菌防御抗原蛋白質46.5kPa（46.5kDa protective antigen；以下46.5kPaということもある）の回収精製法に関するものである。更に、詳細には、本発明は豚丹毒菌抗原活性を有する46.5kPaをコードする遺伝子で形質転換したブレヴィバチルス・チョウシネンシスを培養し、その培養物から46.5kPaを回収精製する方法に関するものであって、特に工業的大量精製法に適した簡便且つ効率的な蛋白質の回収精製方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 豚丹毒菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*）は豚、イノシシ、鯨類、鶏、七面鳥などの食用動物に病原性を持ち、畜産の生産性に大きな被害を与えてきた。家畜伝染病予防法において豚丹毒は監視伝染病の一つに指定され豚において年間3,000頭前後の発生報告がある。また本菌は人にも病原性をもつこと、食肉処理場での多数の豚丹毒症例が摘発されることから、豚肉やその内臓を含む食品の安全性にも脅威となっている。

【0003】 わが国では、強毒株をアクリフラビン添加培地で長期継代培養して作製された豚丹毒菌弱毒株Koganei株から製造された凍結乾燥生ワクチンがひろく豚丹毒菌感染の防御のために使用されてきたが、問題点として、マウスに関節炎発症の病原性をもつこと、抗体の低い豚やSPF豚において重篤な副作用を示すこと、また慢性豚丹毒症例豚の病変からワクチン株が分離されることが指摘されている。

【0004】 一方、不活化ワクチンとしては、豚丹毒菌強毒株の培養菌液をホルマリンで殺菌処理し、その全菌体及び菌体外生産物を水酸化アルミニウムゲルに吸着させて製造したバクテリアワクチン及び全菌体からアルカリ水溶液で抽出した菌体表面非精製蛋白質画分から成る成分ワクチンが豚丹毒の予防用ワクチンとして用いられている。アルカリ抽出蛋白質画分中の有効成分としては、64～66kDaの蛋白質抗原がマウスで感染防御活性を示すとされる（Groschup, M. H. et al. (1991) *Epidemiol. Infect.*, 107, 637-649）

【0005】 他方、本菌の防御抗原の遺伝子組換え体としては、GalanとTimonyが豚丹毒菌の5.4kbの遺伝子断片で組換えたファージを感染させた宿主大腸菌の溶解物上清で免疫したマウス群では14～17%が感染死に対する防御活性を示すこと、また、同溶解物上清に対する免疫血清は66,54,43kDaの蛋白質と反応することを示した（Garan, J. E. et al. (1990) *Infect. Immun.*, 58, 3116-3121）。

【0006】 最近、豚丹毒菌に対して感染防御活性を有するモノクローナル抗体が、血清型2型豚丹毒菌Tamagawa株の64kDaの表面蛋白質を認識すること、またその表面蛋白質の遺伝子がクローニングされ、塩基配

50

3

列と606アミノ酸の配列が決定され、C末に8個の相似な繰り返し配列(19個のアミノ酸からなる8番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。)をもつことが報告された(Makino, S. et al. (1998) Microb. Pathog. 25, 101-109)。

【0007】この64kDa蛋白質はSPAと命名されている。

【0008】SPAをコードする遺伝子で組換えた大腸菌の生菌を接種したマウスは、豚丹毒菌の攻撃に対し防御が成立する。またSPAのうち、菌細胞膜に固着する側のC末繰り返し配列部分が防御活性に必須であることが報告された(Makino, S. et al. (1998) Microb. Pathog. 25, 101-109)。

【0009】更に、血清型1型のFujisawa株の感染防御抗原の遺伝子も同様の配列をとるが、C末の繰り返し配列が1個多く、626個のアミノ酸からなり、C末には9個の相似な繰り返し配列(19個のアミノ酸からなる9番目の配列以外は20個のアミノ酸からなる。)をもつこと、その遺伝子がコードする蛋白質は69kDaの蛋白質であることが示された(Imada, Y. (1999) Proc. Jpn. Pig. Vet. Soc. 34, 12-15)。ここで得られた遺伝子全長または遺伝子全長からC末の繰り返し塩基配列を除いた遺伝子または全長のN末側の一部とC末の繰り返し塩基配列を除いた1029bpの塩基配列で組換えた大腸菌からヒスチジンヘキサマー融合蛋白質として得られた組換え蛋白質は、フロイントコンプリートアジュバント(実用ワクチン用には使用不可)の存在下で感染防御効果を示したと報告されている(今田、上記)。

【0010】しかし、今まで報告された豚丹毒菌の感染防御抗原の組換え体は、ヒスチジンヘキサマーなどとの融合ポリペプチドとして、しかも大腸菌体内に生産させたものであり、宿主菌菌体外の外分泌系として生産する方法はこれまで知られていない。また組換え体で生産された豚丹毒菌の感染防御抗原を、防御免疫誘導のための実用ワクチンとして利用する免疫方法も知られていない。更に、粘膜経路(経鼻、経口、経直腸)でのワクチン投与の開発が、動物へのストレス軽減、省力化、粘膜局所での免疫誘導を目的として要望されているが、豚用の組換え抗原に対する経粘膜免疫方法による防御免疫付与方法は知られていない。さらにまた、マウスでは大腸菌変異易熱性腸管毒素(mLT)が粘膜アジュバントとして、粘膜投与蛋白質抗原の免疫原性を増強するが(Tsujii, T. et al. (1997) Immunology, 90, 176-182)、豚などの家畜ではmLTの粘膜アジュバント活性は知られていない。

【0011】このように豚丹毒菌の感染防御について種々の研究が進められているなかで、渡辺らは、豚丹毒菌の感染防御抗原遺伝子のうち、従来必要とされていたC末の繰り返し配列からなる断片をコードするDNA配列

4

とN末の分泌シグナルをコードするDNA配列を削除したポリヌクレオチドで組換えたプレバチルス・チョウシネンシスの大量培養液の除菌液から夾雑物を除去し、防御免疫誘導活性をもつ高純度の46.5kDa防御抗原(46.5kDa protective antigen; 46.5KPA)を製造できる方法を見出した(特願平11-94004)。渡辺らの発明によりプレバチルス・チョウシネンシスで発現して得られた46.5KPAは、豚丹毒菌の副作用に関係する菌体成分を全く含まないため、ワクチンの安全性の改善に貢献すると考えられた。

【0012】更に、渡辺らは46.5KPAを家畜用アジュバントの併用をもって注射することにより、あるいはマウスで粘膜アジュバント活性が知られる大腸菌の変異無毒組換え易熱性腸管毒素(mLT)とともに経鼻免疫することにより、豚丹毒菌に対する感染・発病防御免疫能を誘導する技術を確立した。以上の知見から、46.5KPAは動物の豚丹毒菌感染予防用のサブユニットワクチンとしての利用価値を有することが判明した。

【0013】遺伝子組換え技術を適用し培養物中に分泌生産された46.5KPAをサブユニットワクチンなどに開発するには、培養物中に混在している菌体、培地由来の成分や同時に分泌生産される夾雑蛋白質やその他の代謝産物などの夾雑物を除去し、目的とする46.5KPAのみを効率的に回収精製する必要がある。この精製工程は簡便でかつ工程数も少ない方がよく、特に精製を工業規模で行う場合には精製工程が複雑であると多大な設備投資が必要であり、そのため、生産コストも高くなってしまいうという問題が生じる。

【0014】一方、菌体外に著量の蛋白質を生産するという卓越した特徴を有する微生物として、本発明者らによってプレバチルス・チョウシネンシスが発見されている。しかしながら、このすぐれた特徴を利用して、プレバチルス・チョウシネンシスを宿主菌とし組換え蛋白質として46.5KPAを菌体外に分泌生産させた場合、この46.5KPAは、培養物中で50%以上が凝集して不溶性の沈殿を形成してしまい、菌体との分離回収が困難であった。そのため、46.5KPAの回収率は低く、精製に要する労力も大きく、精製効率の高い製造方法の開発が必要となっていた。

【0015】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような技術上ないし工業上の必要性に鑑みてなされたものであって、プレバチルス・チョウシネンシスを宿主菌とする異種遺伝子産物の生産において、菌体を含む培養物からの効率的な回収精製技術を提供することにある。即ち、本発明は、プレバチルス・チョウシネンシスを宿主菌とする形質転換体を培養しその培養物中に分泌生産された46.5KPAを共存する菌体及び夾雑物から分離し、簡便かつ高収率に回収精製する方法を提供するのであって、特に工業的な見地から、本発明は、46.

10

20

30

40

50

5

5 KPAの回収精製に特に適した簡便且つ効率的な大量精製法を新たに開発し、これを提供する目的でなされたものである。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、46. 5 KPAをプレバチルス・チョウシネンシスの培養物から効率よく回収精製する方法について鋭意研究を重ねた結果、培養物中の菌体及び46. 5 KPAを濾過膜で回収した後、回収画分のpHをアルカリ域に調整し、アルカリ緩衝液で回収画分を洗浄することにより、46. 5 KPAが可溶化され、濾過液画分に高回収率で溶出してくるのを見いだした。これによりプレバチルス・チョウシネンシスの培養物に含まれる不溶性の46. 5 KPAの殆どが可溶化され、菌体、夾雑蛋白質及びその他の夾雑物を効率よく除くことが可能であることにより非常に簡便かつ効率よく46. 5 KPAを回収精製することが可能になった。本発明は、この有用新知見に基づきなされたものである。

【0017】すなわち本発明は、豚丹毒菌防御抗原蛋白質を含有するプレバチルス・チョウシネンシスの培養物をpH調整及び濾過膜処理によって該培養物中に共存する菌体及び他の夾雑物から分離回収することを特徴とする46. 5 KPA（そのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す）の回収精製法に関するものである。

【0018】

【発明の実施の形態】本発明に用いた組換え豚丹毒菌防御抗原（46. 5 kDa防御抗原）のポリペプチドは、分泌形態または非分泌形態のいずれで生産されてもよいが、分離精製の容易さから分泌形態が好ましい。分泌形態の場合、該ポリペプチドをコードするDNAの上流に任意のシグナルペプチドをコードするDNA配列を連結させる。

【0019】発現ベクターとしては、バチルス属細菌において自律複製可能であって、目的DNAの転写が可能な位置にプロモーターを含有している物を選択できる。または、染色体中へ直接組込み、発現させることでもよい。

【0020】宿主細胞としては、バチルス属細菌やプレバチルス属細菌、特にプレバチルス・チョウシネンシス（*Brevibacillus choshinensis*）が良好に使用できる。

【0021】形質転換法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、PEG法などを用いることができる。

【0022】形質転換された宿主菌を培地中に培養し、発現ベクターに組込まれた目的DNAや染色体に組込まれた目的DNAを発現させ、組換え豚丹毒菌防御抗原（46. 5 kDa防御抗原）を分離精製することができる。本発明は、その効率的な分離精製法に関するものである。

6

【0023】すなわち本発明は、豚丹毒菌防御抗原活性を有する蛋白質（46. 5 KPA）がアルカリ処理によって選択的に可溶化するという新知見に基づき、この新知見を利用して、pH調整、濾過膜処理、イオン交換樹脂処理をそれぞれ選択しただけでよく、その処理順序の決定、処理回数の決定等各種の検討を行って、これらの処理を有機的に結合することにより、46. 5 KPAの回収精製について、工業化、効率化が図られ、画期的な回収精製法の創製にはじめて成功したものである。

【0024】本発明に係る豚丹毒菌防御抗原の回収精製法の骨子は、46. 5 KPA分泌生産性微生物の培養物（菌体、培養液ないし培地成分、46. 5 KPAその他微生物の分泌ないし代謝物などの混合物）について、

（1）精密濾過膜で濾過処理し、中性～弱アルカリ性緩衝液で洗浄し、46. 5 KPAと菌体とを濃縮する工程（濃縮工程）、（2）アルカリ液を用いて濃縮画分のpHを10～12に調整し、46. 5 KPAのみを可溶化するとともに、必要あれば、精密濾過膜上に残留している濃縮画分をアルカリ緩衝液で洗浄することにより、残留している少量の46. 5 KPAを可溶化し、46. 5 KPAを濾過画分に集める工程（濾過可溶化工程）、

（3）所望するのであれば、濾過画分（46. 5 KPA含有液）をイオン交換樹脂処理することにより、夾雑蛋白質を除去して目的蛋白質（46. 5 KPA）を精製分離回収する工程（分離回収工程）、よりなるものである。

【0025】本発明に係る回収精製法は、46. 5 KPAを含有する微生物の培養物に対して広く適用することができる。微生物としては、プレバチルス・チョウシネンシスが挙げられ、例えば、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31は46. 5 KPAを菌体外に分泌生産するので、本発明の回収精製法が特に有効に適用できる。

【0026】具体的には、プレバチルス・チョウシネンシスHPD31-S5（FERMBP-6623）を例示することができる。本菌は、従来はバチルス・プレビス（*Bacillus brevis*）に分類されていたのであるが、現在はプレバチルス・チョウシネンシス（*Brevibacillus choshinensis*）に分類されている（工業技術院生命工学工業技術研究所証明に係る「科学的性質及び分類学上の位置の表示等の証明書」）。

【0027】46. 5 KPA遺伝子は、公知の方法でプレバチルス・チョウシネンシスに組み込めばよく、例えばモレキュラー・クローニング・ア・ラボラトリーマニュアル第2版、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー（*Molecular Cloning 2nd ed. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989）に記載の方法で行えばよい。このように46. 5 KPAをコードする遺伝子で形質転換したプレバチルス・チョウシネンシスを通気攪拌培養することによって、46.

7

5 KPAを含有するプレバチルス・チョウシネンシスの培養物を得ることが出来る。

【0028】上記したところを骨子とする豚丹毒菌抗原タンパク質の回収精製法であるが、更に詳しくは、豚丹毒菌抗原活性を有するタンパク質を含有するプレバチルス・チョウシネンシスの培養物を、下記工程（1）～（3）の工程を経ることにより共存する菌体、夾雑蛋白質及びその他の夾雑物を除去し、豚丹毒菌抗原タンパク質を回収精製する方法に関するものである。

【0029】以下、本発明の精製工程を詳しく説明する。先ず、46.5 KPAを含有するプレバチルス・チョウシネンシスの培養物を以下の工程にしたがって精製する。

（1）46.5 KPA及び菌体と培地由来の成分などの夾雑物を含む培養物を、先ず、必要ある場合には、pHを46.5 KPAが濾過膜を通過しない中性域～弱アルカリ域の範囲に調整する。次に、pH調整した培養物を精密濾過膜を用いて濾過し、46.5 KPA及び菌体を膜上に濃縮する。46.5 KPA及び菌体を膜上に残し、培地成分などの夾雑物質及び濾過画分として除去し、緩衝液、例えば中性域～弱アルカリ域（10～100 mM）のトリス緩衝液（pH 7～9.5）で良く洗浄し、残った夾雑物を洗い流す。濾過に用いる膜は、培地成分などの夾雑物が濾液画分に移行し、46.5 KPA及び菌体が濃縮されるポアサイズを有する濾過膜であればすべての濾過膜を使用することができ、例えば、ポアサイズ0.8 μm以下、好ましくは0.5 μm以下の精密濾過膜を使用することができる。

【0030】（2）（1）の工程で濃縮した46.5 KPA及び菌体のpHを水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等アルカリによって、pH 10.0～12.0（好適には11.0）に調整し、（1）工程で使用した精密濾過膜の膜上に残っている該蛋白質を濾過画分として回収するためにpH 10.0～12.0（好適には11.0）のアルカリ緩衝液を徐々に加えて濃縮液を濾過させることにより、46.5 KPAを濾過画分として回収する。このとき用いるアルカリ緩衝液としては（10～100 mM）グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 10～12）等を用いると良い。

【0031】（3）更に精製する為に、（2）の工程で可溶化し、濾過されてきた濾過画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離回収することが出来る。陰イオン交換樹脂としては、DEAE、DEAA、TEAE、ECTEOLAその他、精製のために常用される陰イオン交換樹脂が適宜使用される。

【0032】本発明は、上記したところにしたがって実施すればよいが、更に具体的には、例えば、本発明を実施するには、該培養物について、下記工程（1）～

（3）にしたがって処理すれば良く、非限定的に例示したこれらの処理により豚丹毒菌抗原タンパク質を効率的

8

に回収精製することができる。

【0033】豚丹毒菌抗原活性を有する46.5 KPAをコードする遺伝子で形質転換したプレバチルス・チョウシネンシスを培養し、その培養物を、（1）精密濾過膜で濾過処理し、更に50 mMトリス緩衝液（pH 8.5）で洗浄することによって培養物中に含まれる培地由来の成分などの夾雑物を濾過画分に除き、豚丹毒菌防御抗原タンパク質と菌体を濃縮する工程、（2）豚丹毒菌防御抗原タンパク質と菌体の濃縮画分を精密濾過膜を用いて50 mMグリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（pH 10～11）で洗浄することにより豚丹毒菌防御抗原タンパク質を濾過画分に集める工程、（3）濾過画分を陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離回収する工程、よりなる豚丹毒菌防御抗原の回収精製法である。

【0034】本発明の回収精製法により、非常に簡便に、プレバチルス・チョウシネンシスの培養物から46.5 KPAを90%以上の回収率で菌体や夾雑物から分離できる。

【0035】以下、本発明の実施例により更に詳しく説明するが、これは例示的なものであり、本発明はこれに限定されるものではない。

【0036】

【実施例1】豚丹毒菌の感染防御抗原遺伝子のクローニング

（1）大腸菌へのクローニング

感染防御抗原遺伝子のクローニングには、豚に敗血症を起こし最も強毒である血清型IaのFujisawa株の染色体DNAを使用した。染色体DNAはリゾチームとアセチルムラミダーゼ（ムタノリシン、シグマ社製）で前処理した菌体を、プロテイナーゼK（フナコシ社製）とSDS処理により溶菌し、フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコールで除蛋白質後、エタノール沈殿して精製した。

【0037】染色体DNAをテンプレートにして（特願平11-94004）をもとに合成した2種類のプライマーERM1（図2上段、配列番号2）ERRV1（図2下段、配列番号3）を用いて豚丹毒菌の感染防御抗原蛋白質遺伝子（図1）の一部（en2）遺伝子（en2：図1の88～1,293番目までのポリヌクレオチド：1,206 bp）をPCR法で増幅した（図3、図4）。

【0038】en2遺伝子の取得には、プライマーERM1とプライマーERRV1を各々100 pmol、Taqポリメラーゼ（宝酒造製）2.5単位、dNTP（宝酒造製）200 μM、pSKW2鋳型DNA 1 ng、100 μl Taq緩衝液（10 mMトリス-塩酸（pH 8.5）、2.5 mM MgCl₂、50 mM塩化カリウム、100 μg/mlウシ血清アルブミン）を混合し、96℃で30秒保持した後、DNAの熱変性

9

(94℃、60秒)、プライマーのアニーリング(54℃、60秒)、プライマーの伸長(70℃、60秒)を25サイクルさせることによって増幅させた。

【0039】遺伝子 e_n2 (1206bp)を、0.8%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を回収した。プラスミドpT Blue (Novagen社製)と先に得た e_n2 遺伝子断片をT4DNAリガーゼ(宝酒造製)を用いて連結した。連結DNAを大腸菌JM109に形質転換し、アンピシリン50mg/ml含有LB寒天培地(1.0%Tryptone、0.5%Yeast Extract、1.0%NaCl、1.5%寒天、pH7.0)に塗布して、アンピシリン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出して e_n2 遺伝子を保持するプラスミドpT Blue e_n を得た。また、ここで得た株をE. coli JM109/pT7 Blue e_n2 とした。

【0040】(2)プレバチルス・チオウシネンシスへのクローニング

Bacillus brevis HPD31-S5/pNH300TP17(FERM BP-5641)をNco I(宝酒造製)とBam HI(宝酒造製)で処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して4.0kbの断片を回収した。さらに、pT7 Blue e_n をNco IとBam HIで処理した後、0.8%アガロースゲル電気泳動に供して1206bpの e_n2 遺伝子断片を回収し、先に得た4.0kbの遺伝子断片とT4DNAリガーゼを用いて連結した。

【0041】連結DNAを用いてバチルス・プレビスHPD31-S5(FERM BP-6623)(現在は、プレバチルス・チオウシネンシスHPD31-S5(FERM BP-6623))をエレクトロポレーション法(Agric. Biol. Chem., 53, 3099-3100(1989))で形質転換し、ネオマイシン50mg/ml含有TM寒天培地(1%ペプトン、0.2%酵母エキス、0.5%肉エキス、1%グルコース、0.001%FeSO₄·7H₂O、0.001%MnSO₄·4H₂O、0.0001%ZnSO₄·7H₂O、1.5%寒天、pH7.0)に塗布して、ネオマイシン耐性を持つ株を選択した。選択株よりプラスミドを抽出して e_n2 遺伝子を保持するプラスミドpNH300 e_n2 を得た(図5)。また、ここで得た株をバチルス・プレビス(プレ

【0042】

【実施例2】形質転換体の培養

プレバチルス・チオウシネンシスHPD31-S5/pNH300 e_n2 (FERM P-17698)を中試験管を用いてネオマイシン50μg/ml含有TM液体培地3mlで30℃で2日間振とう培養を行い、その培養上清をSDS-PAGEにより解析を行った。プレバ

(表1)

10

チルス・チオウシネンシスHPD31-S5/pNH300 e_n2 培養から得られた感染防御抗原の推定分子量は465564Daであり、相当の分子量の位置に染色バンドを示した。以後、46.5KPAと呼ぶ。

【0043】

【実施例3】46.5KPAの生産と精製

46.5KPAを分泌生産する、得られた形質転換体(プレバチルス・チオウシネンシスHPD31-S5/pNH300 e_n2)をペプトン1%、酵母エキス1%、MgSO₄5mM、MnSO₄1mM、FeSO₄36μM、グルコース2%、寒天1.5%、pH7.2の寒天培地にて30℃で一昼夜培養した。これを前記と同じ組成の液体培地100mlを500ml三角フラスコに分注し、120℃、15分間滅菌し、冷却後に接種して30℃で一晩振とう培養を行ったものを前培養液とした。

【0044】2Lジャーファーマンターに前培養と同じ組成の生産培地1Lを分注した後、120℃で15分間滅菌し、冷却後、前培養液10mlを接種し、攪拌数450rpm、通気量1vvm、30℃で3日間培養を行った。

【0045】培養物中の46.5KPA量をSDS-PAGE及びデンストメトリー装置で分析し、精製46.5KPAを標準品として同条件で比較して生産量を求めた結果、培養物中に1.0g/Lの46.5KPAが生産されていた(図6)。

【0046】培養物1Lを0.22μmの精密濾過膜(ペリコンカセットシステム(ミリポア社製))を用いて菌体と46.5KPAを500ml程度まで濃縮後、50mMトリス緩衝液(pH8.5)5Lを徐々に加えながら濾過し、培地由来の成分などの夾雑物を含む液を濾過画分として除去した。

【0047】次に、濃縮液のpHを、5N水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH11.0に調整し、前記と同じ濾過膜を用いて濾過を行って菌体を濾過膜上にトラップし、46.5KPAを濾過画分に回収した。また、濃縮液に50mMグリシン-水酸化ナトリウム液(pH11.0)1.0Lを徐々に加えながら再度洗浄、濾過し、濃縮液中に残っていた少量の46.5KPAを濾過画分に回収した。

【0048】この46.5KPA含有液を、クロマトグラフィー装置(P&Pクロマトグラフィーシステム、東ソー製)、DEAEトヨパール650M(東ソー製)を用い、陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、夾雑蛋白質を除去し目的蛋白質を分離精製を行った。最終的に回収した46.5KPAの回収率及び純度を求めた結果、培養物からの46.5KPAの回収率は60%でその純度は80%であった(表1)。

【0049】

11

12

豚丹毒菌 46.5KPA 及び精製段階における濃度と回収率

精製段階	容 積 (L)	濃 度 (g/L)	46.5KPA量 (g)	回収率 (%)
培養液	3	1.0	3.0	100
0.22 μ m MF膜処理	30	0.09	2.7	90
DEAEカラムクロマト	0.8	2.2	1.8	60

【0050】

【発明の効果】本発明は、培養物から46.5KPAを非常に簡便且つ効率的に回収精製する方法を提供するものであって、特に工業的規模で該タンパク質を回収精製するのに有効である。46.5KPA（そのアミノ酸配列は、配列表の配列番号1に示される）は、豚丹毒菌抗原活性を有するタンパク質であって、豚丹毒成分ワクチン等豚丹毒菌の感染防御に使用できる抗原（豚丹毒菌防

10 御抗原）として移用できるものであり、特に本発明によって高純度の精製46.5KPAを効率的に生産することがはじめて可能となったので、安全性が高くすぐれた豚丹毒に対するワクチンを製造することが可能となった。

【0051】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Higeta Shoyu Co., Ltd.

<120> Recovering and Purifying Method of Recombinant Protective Antigen
against Erysipelothrix rhusiopathiae

<130> 6250

<141> 2000-7-21

<160> 3

<210> 1

<211> 402

<212> PRT

<213> Erysipelothrix rhusiopathiae

<400> 1

```

Asp Ser Thr Asp Ile Ser Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Gln Val
      5              10              15
Gly Leu Leu Pro Val Leu Pro Gly Thr Gly Val Bis Ala Gln Glu
      20              25              30
Tyr Asn Lys Met Thr Asp Ala Tyr Ile Glu Lys Leu Val Ser Leu
      35              40              45
Ile Asn Gln Lys Val Lys Pro Phe Leu Ile Asn Glu Pro Lys Gly
      50              55              60
Tyr Gln Ser Phe Glu Ala Val Asn Glu Glu Ile Asn Ser Ile Val
      65              70              75
Ser Glu Leu Lys Asn Glu Gly Met Ser Leu Gln Asn Ile His His
      80              85              90
Met Phe Lys Gln Ser Ile Gln Asn Leu Ala Thr Arg Ile Gly Tyr
      95              100             105
Arg Ser Phe Met Gln Asp Ala Met Tyr Leu Glu Asn Phe Glu Arg
      110             115             120
Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val Asp Leu Leu Val
      125             130             135
Asn Tyr Glu Val Lys His Arg Ile Leu Val Lys Tyr Glu Gly Lys
      140             145             150
Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe Ile Val Pro Leu Arg

```


155	160	165
Asp Arg Ile Arg Ser Met Asn Glu Ile	Ala Ala Glu Val Asn Tyr	
170	175	180
Leu Pro Glu Ala His Glu Asp Phe Leu Val Ser Asp Ser Ser Glu		
185	190	195
Tyr Asn Asp Lys Leu Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly Leu Gly		
200	205	210
Val Ser Glu Phe Ile Asp Tyr Asn Arg Leu Glu Asn Met Met Glu		
215	220	225
Lys Glu Leu His Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg		
230	235	240
Asn Arg Gln Ile Gln Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu		
245	250	255
Arg Ala Asn Ala Val Val Glu Ser Leu Lys Thr Ile Lys Asp Ile		
260	265	270
Lys Gln Arg Gly Lys Lys Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ile Tyr Ile		
275	280	285
Gln Arg Ser Gly Asp Val Arg Lys Pro Asp Val Leu Gln Arg Phe		
290	295	300
Ile Gly Lys Tyr Gln Ser Val Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu		
305	310	315
Gln Asp Tyr Leu Glu Ser Asp Ile Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp		
320	325	330
Gly Glu Lys Ile Arg Asn Lys Glu Ile Thr Leu Ile Asn Arg Asp		
335	340	345
Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr Arg Ala Gln Ser Ile Ser Glu Ile		
350	355	360
Lys Thr Ile Arg Ala Asp Leu Glu Ser Leu Val Lys Ser Phe Gln		
365	370	375
Asn Glu Glu Ser Asp Ser Lys Val Glu Pro Glu Ser Pro Val Lys		
380	385	390
Val Glu Lys Pro Val Asp Glu Glu Lys Pro Lys Asp		
395	400	402

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 2

ggatccttaa tcttttaggtt tttcttcac

30

<210> 3

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<400> 3

ccatggcttt cgctgattcg acagatattt ctg

33

【図面の簡単な説明】

【図1】豚丹毒菌 Fujisawa 株の1881bp 感染防御抗原遺伝子のヌクレオチド配列を示す。

【図2】豚丹毒菌 46.5KPA をコードする1206bp のポリヌクレオチドのPCR クローニング用プライ

マー（配列番号2及び3）を示す。

【図3】豚丹毒菌 Fujisawa 株の感染防御能を持つ46.5KPA をコードする1206bp のポリヌクレオチドのヌクレオチド配列とアミノ酸配列を示す。

【図4】豚丹毒菌 Fujisawa 株の感染防御能を持

つ46. 5KPAをコードする1206bpのポリヌクレオチドのヌクレオチド配列とアミノ酸配列のつづきを示す。

【図5】豚丹毒菌の1206bpの発現用プラスミドの構造を示す。

【図1】

```

1 ATGAAAGAGA AAAAACACCT ATTTCCGAAA GTAAAGCTTA TGTCTGCTT ACTTTTAAAC
61 GCAATGCCAC TACAAACACG TTTTCTGTAT TCCACAGATA TTCTGTGTAT TCCACATATC
121 GGTGAAACAG TGTGATGTCT CCGATTTTAA CCGGACACAG GGTGACATCC TACAGCAATC
181 AACAAATAGA CTGATGTCTA TATTGAAGAA TTGTATCTCT TAATTATCCA AAAAGTGAGG
241 CCCTTTCTTA TAAATGAACG AAAAGGCTAC CAAAGTTTCC AAGCAATGAA TGAAGAGATT
301 AACTCGATTT TAAATGAACG TAAATGAACG GGAATGATTC TTCAAAACAT TCACCATATG
361 TTTAAACAAA GCATCCAAAG CCGACAAACT AGAATGGCTC ACAGAAATTT TATGACAGAT
421 GCTATGTATC TTGAAATATT TGAAGAGATA AGCATTTCTG AACTTGAATG AGCATACGTT
481 GATTACTCTG TGAATTAAGA GGTGAAGACG CTTATTTTAA TAAATATAGA AGGTAAAGTT
541 AAGGTATAGG CTGCTTATGA AGCATTTATA GTTCTCTTAA GAGATAGATG TCGTAGATTG
601 AATGAATATG CTGCAAGAGT AATATTTATA CTTGAAGCGC ATCAGGATTT CTATGTTTCA
661 GATTCAAGCG AGTATATAGA CAACTAAAT AATATCAACT TTGCTTTGGG TCTAGGGGTC
721 AGCGATTTTA TTGACTATGA CCGGCTGAAA AATATGATGG AAAAAGAACT TCATCCACTG
781 TATCTTGAAC TTATGCTAAT CGCGAGATTC GCCAATATTC AAGTGTATAG AGATGTATAT
841 CCAAGCTTGG AAGTGTGAAA CGCGGCTGTT GATCTCTTAA AGCAATTTAA AGATATATAA
901 CAAAGAGGGA AGAATATACA GGAATCTTCT GAAATTTATA TCCAAAGAGG TGGAGATGTT
961 CAAAGAGGGA ATGTACTTCA AGCATTTTAT GGAATTTATA AATCAATGAT TGAATGAAGA
1021 AAAAATATAC TTCAATTTTA TTTGATATCA GATATTTTGT ATTCTATATG TGTGGATGGC
1081 GCAAAATATA GAAATATAGA AATATCACTC ATCAATAGAG ATGCTATCTT ATCTATGATT
1141 TACAGAGCTC AATCTATTC GGAATTAAG AGCATTTCTG CAGATTTAGA ATCACTTCTC
1201 AATCATTTCC AAAATGAGGA AATGATCTCT AAGTATAGAG CTGAAAGTCC CTTTAAAGTA
1261 CAAAGAGGGA TTGATGAGGA AAAAATCTAA GATCAAGAGA AGCATTTTGA TCAATCAAAA
1321 CCGCAATCCA ATTTAAAGGA AGCGTCTTCT AAGAAAGATA ATAACTGTTT CTATATTTAG
1381 AATTCAGGTT GATGCGCAAC AGCTTGTAGG AAGGTAGCAG ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1441 AATACGGGTT CTATGTTTAC AGCTTGTAGG AAGGTAGCAG ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1501 AATTCAGGTT CAGTGGCAAC AGCATGAGAG AAGGTATCAA ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1561 AATTCAGGTT CAGTGGCAAC AGCATGAGAG AAGGTATCAA ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1621 AATTCAGGTT CAGTGGCAAC AGCATGAGAG AAGGTATCAA ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1681 AATTCAGGTT CAGTGGCAAC AGCATGAGAG AAGGTATCAA ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1741 AATTCAGGTT CAGTGGCAAC AGCATGAGAG AAGGTATCAA ACAAATGCTA CTACTTCTGA
1801 AATTCAGGTA TGTGTTTAC AGCTTCAAAA TCAATTTATG GTAAAGATA TGCATTTAAG
1861 AACTATGAGA GTTAAATA 2

```

【図3】

```

1 GAT TGC ACA GAT ATT TTT GTG GTT GCA CTC GGT CAA GAA GTT GCA TTG CTC GCA GTT
  Asp Ser Thr Asp Ile Ser Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Ile Val Gly Leu Leu Pro Val
61 TAC CTC GGG ACA GGG GGA GAT GCT CAG GAA TAC AAC AAA ACT GAT GAT TAT ATT GAA
  Leu Pro Gly Thr Gly Val Ile Ala Glu Ile Tyr Asn Lys Met Thr Asp Ala Tyr Ile Glu
121 AAA TTG GTA TCT CTA ATT AAT CAA AAA GTG AAG GGG TTT CTT ATA AAT GAA CCA AAG GGG
  Lys Leu Val Ser Leu Ile Asn Glu Lys Val Pro Phe Leu Ile Asn Glu Pro Lys Gly
181 TAC CAA AAT TTC GAA GCA GTG AAT GAA GAG ATT AAC TGG ATT GTA AAT GAA GTT AAA AAT
  Tyr Glu Ser Phe Glu Ile Val Asn Glu Ile Ile Asn Ser Ile Val Ser Glu Leu Lys Asn
241 GAA GGA ATG GAT CTT GAA AAC ATT CAC GAG AAT TTT AAA CAA AAG ATC CAA AAG CTA GCA
  Glu Gly Ser Ser Leu Glu Asn Ile Ile Ile Met Phe Lys Glu Ser Ile Glu Asn Leu Ala
301 ACT ACA ATC CCG TAC AGA AAT TTT ATG CAG GAT CTT ATC TAT CTT GAA AAC TTT GAA ACA
  Thr Arg Ile Gly Tyr Arg Ser Phe Met Glu Asp Ala Met Tyr Leu Glu Asn Phe Glu Arg
361 TTA AAG ATT CTT GAA CTT GAT GAA GCA TAC GAT TTA CTC GTG AAT TAC CAG GTG AAA
  Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val Asp Leu Leu Val Asn Tyr Glu Val Lys
421 CAC GGT ATT TTA GTA AAA TAT GAA GGT AAA GTT AAA GGT AAA GGT CCG TTA CAA GCA TTT
  Ala Arg Ile Leu Val Lys Tyr Glu Gly Lys Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe
481 ATA GTT CTT CTA AAG GAT AGA ATT GAT AAT AAT GAA ATT GAT GCA GCA GTA AAT TAT
  Ile Val Pro Leu Asn Arg Arg Ile Arg Ser Met Asn Glu Ile Ala Ile Glu Val Asn Tyr
541 TTA CTT GAA GCG CAG GAG GAT TTC TTA GTT TGA GAT TCA AAG CAG TAT AAT GAC AAA CTA
  Leu Pro Glu Ala Ile Glu Asn Phe Leu Val Ser Asp Ser Ser Glu Tyr Asn Arg Lys Leu
601 AAT AAT AAT AAT TTT CTT TTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT CTT
  Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly Leu Gly Val Ser Glu Phe Ile Arg Tyr Asn Arg Leu
661 CAA AAT ATG ATG GAA AAA GAA CTT CAG CAA CTG TAT CTT GAA CTT TAT GCT ATG GGG AAA
  Glu Asn Met Met Glu Lys Glu Leu Ile Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg
721 AAT CCG GAA ATT CAA GTT GTA AAG GAT GTA TAT CCA AAT TTT GAA CTT GCG AAG CCG GGT
  Asn Arg Glu Ile Glu Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu Arg Ala Asn Ala Val
781 GTT GAA TCT CTA AAG ACA ATT AAA GAT ATA AAA CAA AAG GGG AAG AAA CTA GAG GAA CTT
  Val Glu Ser Cys Thr Ile Lys Lys Ile Lys Lys Glu Arg Gly Lys Lys Leu Glu Glu Leu
841 CTT GAA ATT TAT ATC GAA AAT AAT GAA GAT GTT GAA GAA GAT GTA CTC CAA GAA TTT
  Leu Glu Ile Tyr Ile Glu Arg Ser Gly Asp Val Arg Lys Pro Asp Val Leu Glu Arg Phe

```

【図2】

BamHIサイト

(配列番号2)

```

ggatcc tta atc ttt agg ttt ttc ttc atc
stop Asp Lys Pro Lys Glu Glu Asp

```

NcoIサイト

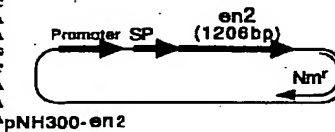
(配列番号3)

```

cc atg gct ttc gct gat tgg aca gatatttctg
Met Ala Phe Ala Asp Ser

```

【図5】



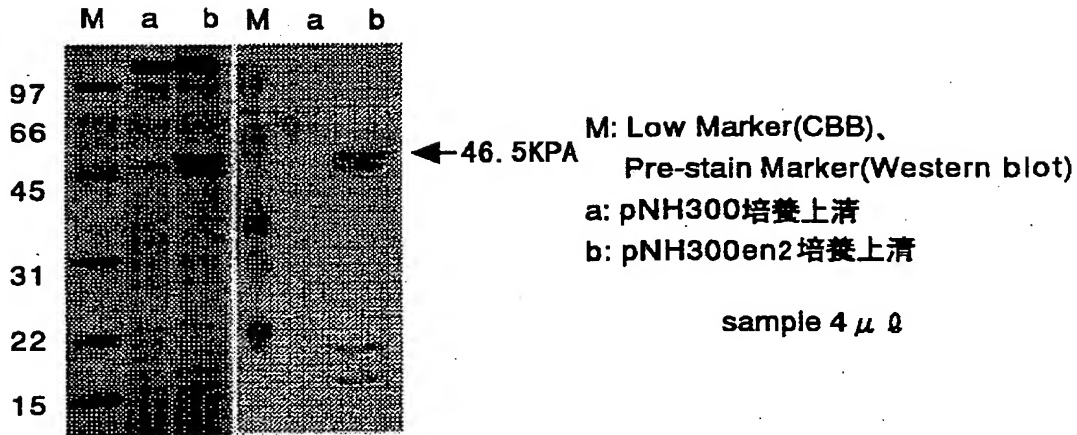
【図4】

```

901 ATT GGA AAA TAT CAA TGA CTA GTT GAT GAA GAA AAA AAT AAA CTT CAA GAT TAT TTA GAA
  Ile Gly Lys Tyr Glu Ser Val Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu Glu Asp Tyr Leu Glu
961 TCA GAT ATT TTT GAT TGA TAT AAT GTG GAT GCG GAG AAA ATA AGA AAT AAA GAA ATT ACA
  Ser Asp Ile Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp Gly Glu Lys Ile Arg Asn Lys Glu Ile Thr
1021 CTC ATC AAT AAG GAT GCA TAC TTA TCT ATG ATT TAG AGA GCT GAA TCG ATT TCG GAA ATT
  Leu Ile Asn Arg Asp Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr Arg Ala Glu Ser Ile Ser Glu Ile
1081 AAG ACG ATT CTT GCA GAT TTA GAA TGA CTT GTT AAA TGA TTA CCA AAT GAA GAA AAT GAC
  Lys Thr Ile Arg Ala Asn Leu Glu Ser Leu Val Lys Ser Phe Glu Asn Glu Glu Ser Asp
1141 TCT AAA CTA GAG CTT CAA AAT CCG GTT AAA GTA GAA AAA CCA GAT GAT GAA GAA AAA CTT
  Ser Lys Val Glu Pro Glu Ser Pro Val Lys Val Glu Lys Pro Val Asp Glu Glu Lys Pro
1201 AAA GAT TAA 1209
  Lys Asp ***

```

【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7		識別記号	F I	テームコード (参考)
C 1 2 P	21/02		C 1 2 R 1:01)	
//(C 1 2 N	15/09	Z N A	(C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 R	1:01)		C 1 2 R 1:01)	
(C 1 2 P	21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R	1:01)		C 1 2 R 1:01)	
(72) 発明者 宮内 明			Fターム(参考)	4B024 AA01 AA10 BA31 CA03 DA05
千葉県銚子市高田町3-850		30		EA04 GA11
(72) 発明者 村橋 保昭				4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 CE06
千葉県銚子市三軒町8-9				CE11 DA04
(72) 発明者 横溝 祐一				4B065 AA01X AA01Y AB01 AC14
茨城県つくば市並木4丁目11-919-103				BA02 CA24 CA43
(72) 発明者 今田 由美子				4C085 AA03 BA11 CC07 DD23 DD34
茨城県つくば市吾妻18-1 405-404				EE01
(72) 発明者 辻 孝雄				4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10
愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98 学校				CA11 DA86 EA31 FA72 FA74
法人藤田学園 内				GA01 GA10 GA23

BEST AVAILABLE COPY